

PHÂN BIỆT CURCUMIN TỰ NHIÊN VÀ TỔNG HỢP BẰNG KẾT HỢP PHÂN TÍCH HPLC VÀ PHÂN TÍCH ĐỒNG VỊ CARBON ^{14}C

Vũ Văn Hà^{1*}, Nguyễn Đức Hùng¹, Lê Hồng Oanh¹, Võ Thị Anh², Phương Thiện Thương¹

¹Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Hàn Quốc (VKIST); ²Viện Khoa học và Kỹ thuật Hạt nhân

*Email: vvha@most.gov.vn

(Nhận bài ngày 04 tháng 10 năm 2022)

Tóm tắt

Curcuminoid là các hoạt chất được chiết xuất từ dược liệu nghệ vàng và được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực gồm dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm. Tuy nhiên, trên thị trường có rất nhiều mẫu curcumin tổng hợp hóa học và bán với giá rất thấp so với curcuminoid có nguồn gốc tự nhiên. Nghiên cứu này xây dựng phương pháp xác định nguồn gốc tự nhiên - tổng hợp của các mẫu curcumin trên thị trường bằng phương pháp phân tích đồng vị phóng xạ ^{14}C kết hợp với phân tích HPLC. Kết quả cho thấy mẫu curcuminoid từ tự nhiên có hàm lượng curcumin I < 84,21% (so với tổng curcumin I, II, III), đồng thời có hoạt độ phóng xạ trong khoảng 13,68 - 13,92 dpm/gC; còn mẫu curcumin tổng hợp có hàm lượng curcumin I là 100% (so với tổng curcumin I, II, III) và có hoạt độ phóng xạ thấp $\leq 5,38$ dpm/gC. Kết quả này gợi ý một phương pháp kiểm soát xác định nguồn gốc curcuminoid tự nhiên hay tổng hợp, cũng như chất lượng của các sản phẩm có chứa curcumin.

Từ khóa: Curcuminoid tự nhiên, Curcumin tổng hợp, Phân biệt tự nhiên - tổng hợp, Phân tích đồng vị phóng xạ, Carbon-14.

Summary

Distinguishing Natural Curcuminoid and Synthetic Curcumin by Combination of ^{14}C Carbon Isotope Analysis and HPLC Analysis Methods

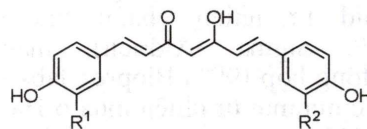
Curcuminoids, the major components of turmeric, are widely used as a traditional medicine and as food additive for their unique aromatic and coloring properties. Curcuminoids extracted from turmeric compose of curcumin I, demethoxycurcumin (curcumin II) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III), but their quantity and composition vary widely according to the plant origin. Besides natural sources, synthetic curcumin derived from petrochemicals is also available in the Vietnamese market at a much lower cost. In this study, we employed HPLC analysis in combination with ^{14}C radioisotope analysis as an accurate tool for composition assay and natural-synthetic origin determination of curcumin samples to evaluate their quality and value. As a result, Natural curcuminoids samples contained of less than 84.21% w/w of curcumin I (compared to the total curcumin I, II and III), and its radioactivity in the range of 13.68 - 13.92 dpm/gC; while the synthetic curcumin samples were constituted of only curcumin I, and the radioactivity values were lower than 5.38 dpm/gC. These results suggested an advanced method for quality and origin control of curcumin samples in the market and will provide a useful guidance for manufacturing healthcare products in Vietnam.

Keywords: Natural curcuminoid, Synthetic curcumin, Isotope analysis, Carbon-14, Natural-synthetic origin determination.

1. Đặt vấn đề

Curcuminoid (thường được gọi là curcumin) là hoạt chất tự nhiên được chiết xuất từ dược liệu nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) có nhiều tác dụng dược lý nên được sử dụng rất rộng rãi trong dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm [1],[2]. Ước tính thị trường curcumin sử dụng hàng năm trên toàn thế giới đạt 74,7 triệu USD trong năm 2021 và có chiều hướng tăng lên hàng năm [3]. Trước đây, chỉ có curcuminoid tự nhiên được sử dụng để sản xuất các sản phẩm, nhưng hiện nay, curcumin đã được tổng hợp bằng phản ứng hóa học có bán trên thị trường [2].

Curcumin tự nhiên là hỗn hợp của dẫn xuất diarylheptanoid được chiết xuất và tinh chế từ thân rễ cây nghệ (*Curcuma longa* L.), gồm có chủ yếu ba hợp chất (Hình 1), gồm curcumin (curcumin I), demethoxycurcumin (curcumin II) và bis-desmethoxycurcumin (curcumin III).



Curcumin I: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{OCH}_3$

Curcumin II: $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OCH}_3$

Curcumin III: $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}$

Hình 1. Công thức cấu tạo của các curcumin I, II, III

Curcumin tổng hợp (sCUR) được sản xuất bằng tổng hợp hóa học thường chỉ có curcumin I cùng một số tạp chất, không có curcumin II và III [2],[4]. Về tác dụng sinh học, có những bằng chứng cho thấy hoạt tính của nCUR (hỗn hợp 03 hợp chất) vượt trội hơn so với sCUR trong nhiều nghiên cứu [5],[6],[7]. Vì vậy, nCUR được đánh giá cao hơn và có giá bán cao hơn, trên thị trường hiện nay nCUR có giá bán cao hơn gấp đôi so với sCUR được nhập từ nước ngoài về. Do vậy việc phân biệt giữa nCUR và sCUR và kiểm soát chất lượng nguyên liệu curcumin là cần thiết.

Phân tích sắc ký như sắc ký lớp mỏng (TLC) hay sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thì nCUR có ít nhất 03 hợp chất curcumin trong khi sCUR chỉ có một chất. Tuy nhiên, vì lợi nhuận nên trên thị trường hiện nay có nhiều mẫu curcumin được bán cố trộn lẫn giữa nCUR và sCUR thì chỉ định tính bằng TLC và HPLC sẽ không phân biệt được. Để giải quyết vấn đề trên, Dược điển Mỹ (USP) quy định nCUR phải chứa tối thiểu 95% curcuminoid dựa trên khối lượng khô, bao gồm curcumin (curcumin I) 70 - 80%, demethoxycurcumin (curcumin II) 15 - 25% và bisdemethoxycurcumin (curcumin III) 2,5 - 6,5% [8]. Nhưng nếu trộn lẫn sCUR với nCUR bằng tỷ lệ hợp lý thì phương pháp của Dược điển Mỹ cũng không giải quyết được, đặc biệt là các sCUR đã được đưa vào trong sản phẩm cuối cùng.

Thực tế thì Việt Nam chỉ sản xuất được nCUR (chiết xuất từ nghệ), còn nhập khẩu sCUR về để bán trà trộn với nCUR và dùng để sản xuất các sản phẩm. Nhưng đến nay chưa có nghiên cứu xác định nguồn gốc thành phần các mẫu nguyên liệu curcumin và sản phẩm chứa curcumin được bán trên thị trường Việt Nam. Nghiên cứu này trình bày kết quả nghiên cứu xác định nguồn gốc tự nhiên - tổng hợp của các mẫu nguyên liệu curcumin bằng phương pháp phân tích đồng vị ^{14}C kết hợp phân tích HPLC-PAD.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Hóa chất, dung môi, chất chuẩn:

Các dung môi đạt yêu cầu cấp độ phân tích (Merck), chất chuẩn curcumin I (≥ 98 , Batch: 14832, Phytolab), curcumin II ($\geq 95\%$, Batch 87929973, Phytolab), curcumin III ($\geq 95\%$, Lot: BCCC 8680 Sigma -Aldrich). Các mẫu curcumin thu thập trên thị trường gồm: mẫu M1 - curcuminoid tự nhiên chuẩn thứ cấp (lot: LRAC3389, Sigma -Aldrich); mẫu M2 - curcumin tổng hợp (99% Bioprex labs - Ấn Độ); mẫu M3 - curcumin tự nhiên mua ở Hà Nội; mẫu M4, M9-M13 - curcumin mua tại Hà Nội; mẫu M5, M6 - curcumin mua tại Nam Định; mẫu M7 - curcumin mua tại Bắc Giang; mẫu M8 - curcumin mua tại Bắc Ninh; mẫu M14 - curcumin mua tại Hải Phòng, mẫu M15 - curcumin tự nhiên nhóm nghiên cứu tự chiết tách, tinh chế từ thân rễ nghệ vàng thu tại Hải Dương. Mẫu M16 - curcumin I tự nhiên nhóm nghiên cứu tách từ mẫu curcumin tự nhiên M15 bằng phương pháp sắc ký cột trong phòng thí nghiệm.

Thiết bị, dụng cụ: HPLC Shimadzu 20A (2020), detector PDA được hiệu chuẩn (của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Hàn Quốc). Thiết bị Task Benzen Synthesisze (dùng để tổng hợp benzen từ nguồn carbon từ mẫu curcumin), hệ nhập nháy lỏng Quantulus GCT® 6220 (dùng để đo phóng xạ β từ mẫu benzen tổng hợp) của Phòng thí nghiệm thủy văn đồng vị - Viện Khoa học và Kỹ thuật hạt nhân

đã được hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025:2005 với sai số tương đối của giá trị đo là $<5\%$, và độ nhạy của phép đo là $0,0588 \text{ dpm/gC}$ được xác định dựa trên mẫu chuẩn có giá trị $19,36 \text{ dpm/gC}$ và mẫu phóng.

Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp phân tích HPLC theo tài liệu tham khảo [8],[9]. Cụ thể:

Mẫu thử sử dụng cho thẩm định phương pháp là mẫu M3.

Chuẩn bị dung dịch thử: Cân 5 mg bột curcumin cho vào bình nón 100ml, thêm 50,0 ml methanol, siêu âm cho tan hết mẫu, lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$, lượng mẫu tiêm $10 \mu\text{l}$.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: pha dung dịch chuẩn gốc curcumin I, curcumin II, curcumin III trong methanol có nồng độ tương ứng $200 \mu\text{g/ml}$. Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng thành dãy các dung dịch có nồng độ $50 \mu\text{g/ml}$; $25 \mu\text{g/ml}$; $12,5 \mu\text{g/ml}$; $10 \mu\text{g/ml}$; $5 \mu\text{g/ml}$; $2 \mu\text{g/ml}$.

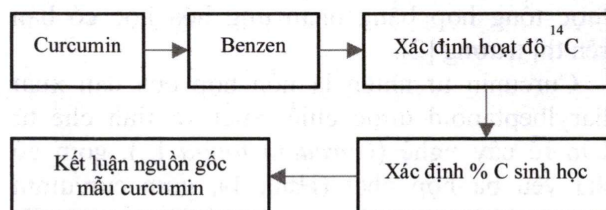
Phương pháp phân tích định tính, định lượng các curcumin được thực hiện trên hệ thống HPLC ghép nối với detector SPD-M40 PDA, cột RP-C18 YMC ($25\text{cm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Hệ dung môi pha động acetonitril (CH_3CN , A) và nước chứa $0,1\%$ acid formic (B), chương trình gradient rửa giải $40 - 50\%$ (A) trong $0 - 30$ phút, $50 - 65\%$ (A) trong $30 - 35$ phút, $65 - 70\%$ (A) trong $35 - 42$ phút, 70% (A) trong $42 - 55$ phút và $70 - 100\%$ (A) trong $55 - 60$ phút. Tốc độ dòng $1,0 \text{ mL/phút}$. Bước sóng hấp thụ 270 nm và 420 nm .

Mẫu tự tạo thêm chuẩn curcumin (I, II, III): Chuẩn bị mẫu tự tạo tại 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao so với nồng độ định lượng bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn curcumin I, II, III vào nền mẫu là mẫu thử chứa hoạt chất. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 lần độc lập.

Thẩm định phương pháp HPLC: Phương pháp được đánh giá theo hướng dẫn của ICH [10] và AOAC [11], dựa trên các chỉ tiêu độ đặc hiệu, độ tương thích hệ thống, tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp.

Phương pháp phân tích đồng vị phóng xạ ^{14}C (xác định nguồn gốc carbon sinh học của ISO 16620) [12]:

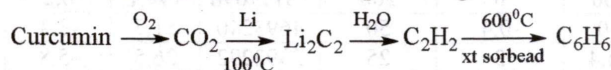
Phương pháp phân tích ^{14}C của các mẫu curcumin được thực hiện theo các bước như Hình 2.



Hình 2. Sơ đồ phân tích ^{14}C trong các mẫu curcumin

Chi tiết quy trình xác định hàm lượng carbon nguồn gốc sinh học trong mẫu bao gồm các bước [12]:

Chuẩn bị mẫu đo: Carbon trong mẫu phân tích được chuyển thành carbon ở dạng benzen trên thiết bị TASK BENZEN theo sơ đồ phản ứng sau:



Hình 3. Sơ đồ tổng hợp benzen từ mẫu curcumin

Ban đầu mẫu curcumin ở dạng bột mịn được đốt trong buồng đốt với oxy tinh khiết để chuyển toàn bộ carbon thành dạng CO_2 . Sau đó khí CO_2 được cho phản ứng chứa Li kim loại nóng chảy ở 100°C để tạo thành Li_2C_2 . Tiếp đến là thủy phân Li_2C_2 bằng nước cất tạo thành khí axetylen (C_2H_2), cuối cùng khí axetylen được chuyển thành benzen (C_6H_6) qua phản ứng trime hóa axetylen (C_2H_2) trong sự có mặt của chất xúc tác sorbead ở 600°C . Sau phản ứng benzen được chưng cất lấy ra khỏi thiết bị TASK BENZEN.

Dung dịch mẫu đo được chuẩn bị gồm 3ml benzen mẫu đo trộn cùng với $3 \times 10^{-4}\text{g}$ 2,5-diphenyloxazole (PPO) và $3 \times 10^{-6}\text{g}$ [1-4, bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzene] (POPO) cùng 0,5 ml toluen đưa vào trong hộp đựng mẫu giống như mẫu chuẩn.

Phân tích ^{14}C trong mẫu benzen: Mẫu đo được đặt vào khay đo của hệ đo nhấp nháy lỏng phòng thấp Quantulus GCT® 6220. Tất cả lượng dung dịch trên được đựng trong bình vial chuyên dụng làm bằng vật liệu có hoạt độ phóng xạ thấp.

Xác định hoạt độ carbon phóng xạ trong mẫu: Từ những số liệu thu được ta tiến hành tính toán xác định hoạt độ phóng xạ của các mẫu dựa trên mẫu chuẩn với điều kiện mẫu chuẩn và mẫu cần xác định phải đo trong cùng điều kiện như nhau.

Xác định hàm lượng carbon sinh học: Tính toán hàm lượng carbon có nguồn gốc sinh học so với tổng khối lượng mẫu, dựa trên kết quả định lượng ^{14}C và hệ số hiệu chỉnh theo công thức (1) trong tiêu chuẩn ISO-16620-2: 2019 [12].

$$x_B = \frac{^{14}\text{C}_{\text{activity}}}{13,56 \times \frac{\text{REF}}{100} \times m} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

x_B là hàm lượng carbon có nguồn gốc sinh học so với khối lượng mẫu.

$^{14}\text{C}_{\text{activity}}$ là hoạt độ của ^{14}C có trong mẫu, đơn vị dpm/gC.

REF: là hệ số hiệu chỉnh cho giá trị 100% carbon sinh học theo năm. Trong nghiên cứu này giá trị REF được tham khảo từ công bố của đại học Groningen [13].

m: khối lượng mẫu phân tích, đơn vị gam.

Xác định LOD của phương pháp: Được xác định dựa trên nguyên tắc đánh giá độ nhạy của phép đo, nghĩa là xác định hoạt độ phóng xạ nhỏ nhất mà hệ thiết bị có khả năng phát hiện được và tuân theo quy

tắc $3\sqrt{N_0}$ với công thức xác định như sau:

$$A_{\min} = \frac{3\sqrt{2n_\phi}}{\varepsilon\sqrt{k_\phi t}} = \frac{4,24\sqrt{n_\phi}}{\varepsilon\sqrt{k_\phi t}} \quad (2)$$

Trong đó:

n_ϕ là tốc độ đếm của phòng

k_ϕ số lần đèn phòng

t là thời gian mỗi lần đếm

ε là hiệu suất ghi bức xạ beta của hệ đo xác định theo phép đo của nguồn phóng xạ chuẩn.

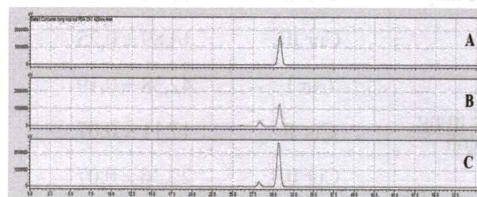
3. Kết quả và bàn luận

Phân biệt curcumin tự nhiên và tổng hợp bằng phân tích HPLC

Phương pháp HPLC được kiểm tra độ đặc hiệu với dung môi pha mẫu là MeOH, kết quả dung môi pha mẫu không xuất hiện pic tại thời gian lưu của curcumin I, II và III.

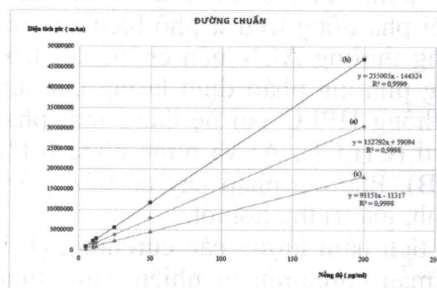
Tính thích hợp của hệ thống được khảo sát qua phân tích 6 mẫu hỗn hợp chất curcumin (I, II và III). Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic đều < 2%. Do đó phương pháp đảm bảo tính thích hợp.

Kết quả phân tích HPLC cho thấy trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn curcuminoid tự nhiên: thời gian lưu của pic curcumin I, curcumin II, curcumin III tương ứng tại 30,49 phút, 28, 09 phút và 25,82 phút thời gian lưu này cũng trùng với thời gian lưu của các chất chuẩn curcumin I, curcumin II, curcumin III (Hình 4).



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu curcumin tổng hợp (A), mẫu curcumin tự nhiên (B) và mẫu curcumin C (mẫu có chứa đồng thời curcumin tự nhiên và curcumin tổng hợp)

Độ tuyến tính và đường chuẩn của phương pháp được xác định thông qua phân tích dãy các dung dịch chuẩn curcumin (I, II, III) ở 6 nồng độ khác nhau. Kết quả được xác định như Hình 5, giá trị R^2 của 3 chất phân tích đều > 0,995.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ Curcumin I (a), curcumin II (b), curcumin III (c) và diện tích pic

Bảng 1. Sai số tính lại từ đường chuẩn.

C (ug/ml)	Curcumin I			Curcumin II			Curcumin III			
	S _{pic}	C tính lại	Độ lệch (%)	S _{pic}	C tính lại	Độ lệch (%)	C (ug/ml)	S _{pic}	C tính lại	Độ lệch (%)
200	30552076	199,5	0,2	46855261	200	0	200	18177698	199,1	0,2
50	8001771	52	-4,1	11656163	50	-0,4	50	4693240	51,7	-3,4
25	3873197	25	-0,2	5555193	24,4	3	25	2392292	26,5	-5,8
12,5	1889425	12	3,5	2892693	12,1	-3,3	12,5	1040190	11,6	6,9
10	1550674	9,8	1,5	2362482	10,5	-6,5	10	814148	9,2	8,5
5	706924	4,3	13,4	901291	4,3	11,3	5	387648	4,5	10,4

Dựa theo kết quả Hình 5, phương trình đường chuẩn của curcumin I là $y = 152792x + 59094$; curcumin II là $y = 235005x - 144324$; curcumin III là $y = 91151x - 11317$. Trong đó y là diện tích pic, x là nồng độ của curcumin I, II, III phân tích. Nồng độ của curcumin được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn và diện tích pic đo được.

Độ lặp lại được xác định qua phân tích mẫu M3: 6 lần lặp lại, kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%), hàm lượng của curcumin I (0,37%), curcumin II (0,42%), curcumin III 0,84%, với RSD (%) < 2%.

LOD được xác định tại nồng độ mà ở đó chiều

cao của pic hoạt chất gấp khoảng 3 lần so với độ nhiễu đường nền. Pha loãng dung dịch chuẩn curcumin I 17,9 µg/ml, curcumin II 15,44 µg/ml và curcumin III 10,42 µg/ml và tiến hành sắc ký, kết quả thu được LOD là 0,0358 µg/ml đối với curcumin I, 0,00772 µg/ml với curcumin II và 0,0016 µg/ml với curcumin III.

Độ đúng được xác định qua phân tích mẫu M3 thêm chuẩn curcumin (I, II và III) ở các mức nồng độ thấp, trung bình và cao. Kết quả cho thấy hàm lượng thu hồi của các chất curcumin (I, II, III) từ 99–102%, với RDS (%) < 2%. Phương pháp đảm bảo độ đúng.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ thu hồi curcumin (I, II, và III)

Mức nồng độ	Chất chuẩn	Lượng có sẵn (µg/ml)	Lượng thêm vào (µg/ml)	Lượng tìm lại (µg/ml)	% Thu hồi - RSD (%)
Mức thấp	Cur I	28,56 ± 0,34	6,80	35,65 ± 0,56	100,81 ± 0,643 0,64
	Cur II	11,50 ± 0,12	3,29	15,03 ± 0,12	101,58 ± 0,47 0,46
	Cur III	14,89 ± 0,25	3,98	19,19 ± 0,43	101,67 ± 0,92 0,90
Mức trung bình	Cur I	42,38 ± 0,19	28,53	70,50 ± 0,15	99,42 ± 0,08 0,08
	Cur II	17,11 ± 0,07	12,17	29,34 ± 0,20	100,18 ± 0,46 0,46
	Cur III	22,36 ± 0,07	15,27	37,51 ± 0,48	99,68 ± 1,09 1,09
Mức cao	Cur I	56,16 ± 0,45	52,34	109,72 ± 0,91	101,12 ± 0,44 0,44
	Cur II	22,55 ± 0,12	21,68	44,16 ± 0,31	99,82 ± 0,43 0,43
	Cur III	28,69 ± 0,64	28,47	57,33 ± 0,17	100,31 ± 0,85 0,85

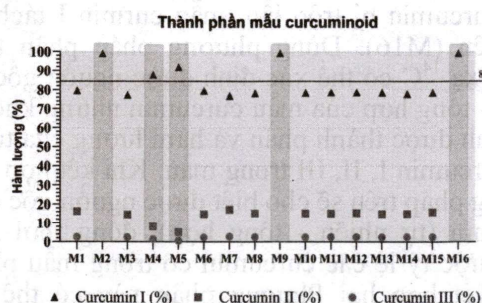
Trong USP-43, curcuminoid được phân tích hàm lượng các curcumin (I, II và III) trên hệ thống HPLC, cột phân tách C-18 với hệ dung môi pha động THF/nước chứa acid citric. Do dung môi pha động trên ít phổ biến so với dung môi thông thường ACN nên chúng tôi lựa chọn xây dựng phương pháp định lượng curcuminoid trên hệ thống HPLC với hệ dung môi pha động acetonitril (CH₃CN, A) và nước chứa 0,1% acid formic (B). Phương pháp này có thời gian phân tích nhanh, giá trị thu hồi tốt.

Phân tích hàm lượng các curcumin (I, II, III) đối với mẫu curcumin tự nhiên, curcumin tổng hợp và một số mẫu curcumin mua trên thị trường. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Từ kết quả phân tích HPLC nhận thấy: Mẫu chuẩn M1-curcuminoid tự nhiên, có đầy đủ 3 pic **curcumin I**, curcumin II, curcumin III với hàm lượng curcumin 79,64%, curcumin II 16,19% và curcumin III 2,57%, kết quả này phù hợp với mô tả của dược điển Mỹ USP-43.

Mẫu curcumin I tổng hợp (M2) chỉ có 1 pic duy nhất là curcumin I với hàm lượng 99,01%. So sánh với USP-43, thì mẫu này không đạt yêu cầu do không có hoặc hàm lượng curcumin II và curcumin III nhỏ hơn tiêu chuẩn.

Kết quả phân tích thành phần mẫu curcumin còn được sử dụng để nhận biết sự có mặt của curcumin I tổng hợp trong mẫu phân tích và kết quả được chỉ ra ở Bảng 2 và Hình 4.



Hình 6. Kết quả phân tích HPLC các mẫu curcumin nghiên cứu. Chấm tam giác cho biết tỷ lệ curcumin I trên tổng curcumin I, II, III, chấm vuông biểu thị giá trị tỷ lệ curcumin II trên tổng curcumin I, II, III, chấm tròn biểu thị giá trị curcumin III trên tổng curcumin I, II, III.

Bảng 3. Phân biệt nguồn gốc tự nhiên và tổng hợp mẫu curcumin bằng phân tích HPLC và phân tích đồng vị carbon ^{14}C

Mẫu	Phương pháp phân tích						Đồng vị carbon ^{14}C		
	HPLC (USP 43)			Tỷ lệ curcumin I / Tổng Cur I, II, III (%)			Hoạt độ phóng xạ (dpm/gC)	Carbon sinh học (%)	Mẫu có thành phần tổng hợp (**)
M1	79,64	16,19	2,57	98,40	80,74	-	13,92 ± 0,05	100	-
M2	99,01	-	-	99,01	100,00	Có	5,28 ± 0,05	38,9	Có
M3	77,25	14,57	2,35	94,17	82,03	-	13,92 ± 0,05	100	-
M4	87,87	8,05	1,44	97,36	90,25	Có	9,78 ± 0,05	71,2	Có
M5	91,88	5,02	0,72	97,62	94,1	Có	9,30 ± 0,05	66,7	Có
M6	79,50	14,80	2,38	96,68	82,23	-	13,80 ± 0,05	100	-
M7	76,80	17,10	2,70	96,60	79,50	-	13,80 ± 0,05	100	-
M8	78,20	15,20	2,51	95,90	81,53	-	13,68 ± 0,05	100	-
M9	99,20	-	-	99,20	100,0	Có	5,38 ± 0,05	39,8	Có
M10	78,42	15,15	2,48	96,05	81,65	-	13,92 ± 0,05	100	-
M11	78,70	15,10	2,51	96,31	81,71	-	13,74 ± 0,05	100	-
M12	78,68	15,35	2,52	96,48	81,55	-	13,86 ± 0,05	100	-
M13	78,58	14,88	2,48	95,94	81,90	-	13,68 ± 0,05	100	-
M14	77,88	14,95	2,50	95,31	81,71	-	13,98 ± 0,05	100	-
M15	78,50	15,80	2,58	96,88	81,02	-	13,92 ± 0,05	100	-
M16	98,6	-	-	98,6	100,0	-	13,92 ± 0,05	100	-

Cur: curcumin; * Curcumin I tổng hợp được xác định có mặt trong mẫu phân tích bằng phương pháp HPLC khi tỷ lệ curcumin trên tổng số curcuminoids được tìm thấy là hơn > 84,21% (USP - 43); ** Thành phần curcumin I tổng hợp có trong mẫu phân tích được xác định khi hàm lượng carbon sinh học < 100%.

LOD của phép đo hoạt độ phóng xạ carbon-14 là 0,0588 dpm/gC (tương ứng với giá trị đo của mẫu chứa 4,3% carbon sinh học) được xác định dựa trên mẫu chuẩn có giá trị 19,36 dpm/gC và mẫu phòng benzen không phóng xạ thu được từ việc tổng hợp benzen từ các mẫu đá vôi tuổi Devon sưu tập tại khu vực Ninh Bình. Kết quả xác định LOD được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định LOD của phương pháp

			Đơn vị
Số đếm mẫu chuẩn	Nst	35,13	Cpm
Khối lượng mẫu chuẩn	Mstd	2,63	G
Giá trị thực của mẫu chuẩn	Real	19,36	dpm/g
Hiệu suất ghi	ϵ	0,69	
Số đếm phóng	k θ	0,274	cpm
Số vòng lặp đếm phóng	Kp	30	vòng
Thời gian mỗi lần đếm	T	100	phút
Độ nhạy thiết bị	Amin	0,0588	dpm/g

Theo đó curcumin I tổng hợp được xác định có mặt trong mẫu phân tích bằng phương pháp HPLC khi tỷ lệ curcumin I trên tổng số curcumin (I, II, và III) được tìm thấy là > 84,21% (84,21% là giá trị max curcumin I / (tổng curcumin I, II, III) theo USP-43).

Phân biệt curcumin tự nhiên và tổng hợp bằng kết hợp phân tích HPLC phân tích đồng vị carbon ^{14}C

Để xác định nguồn gốc tự nhiên - tổng hợp của mẫu curcumin trên thị trường Việt Nam nhóm nghiên cứu đã sử dụng phương pháp phân tích hàm lượng carbon sinh học theo tiêu chuẩn ISO -16620 đã được trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu [12]. Kết quả phân tích hàm lượng carbon sinh học các mẫu trên thị trường được trình bày ở Bảng 3.

Phương pháp này xác định được mẫu chứa từ 4,3% carbon sinh học đến mẫu chứa 100% carbon sinh học tương ứng với mẫu chứa từ 4,3 - 100% curcumin tự nhiên. Tương ứng với curcumin tổng hợp từ 95,7 - 0%. Như vậy, phương pháp này xác định tỷ lệ curcumin tổng hợp trong mẫu gián tiếp thông qua phép định lượng curcumin tự nhiên (với qui ước tổng lượng curcumin tự nhiên và tổng hợp là 100%).

Kết quả phân tích các mẫu curcumin (Bảng 3) cho thấy, mẫu chuẩn curcuminoid từ nguồn gốc tự nhiên (M1) có hàm lượng carbon sinh học 100% phù hợp với yêu cầu của ISO-16620. Mẫu curcumin tự nhiên M15, M16 được nhóm chuẩn bị bằng cách chiết xuất và tinh chế cũng có hàm lượng carbon sinh học 100%. Mẫu mua tại thị trường (M4 và M5), hàm lượng carbon sinh học là 71,2% và 66,7% chỉ ra sự có mặt đồng thời

curcumin tổng hợp và curcuminoid tự nhiên trong mẫu phân tích.

Hoạt độ phóng xạ mẫu curcumin I tinh khiết tách từ tự nhiên (M16) là 13,92 dpm/gC và mẫu curcumin I tinh khiết tổng hợp (M2) có hoạt độ phóng xạ là 5,28 dpm/gC thấp hơn rất nhiều so với giá trị hoạt độ phóng xạ của mẫu M16. Như vậy phương pháp phân tích đồng vị carbon ^{14}C phân biệt được nguồn gốc tự nhiên, tổng hợp của 2 mẫu này. Trong khi phương pháp phân tích HPLC không chỉ ra được được nguồn gốc tự nhiên của mẫu M16 khi so sánh với USP - 43 (mẫu không đạt yêu cầu do không có hoặc hàm lượng curcumin II và curcumin III nhỏ hơn quy định).

So sánh kết quả phân tích trên với tiêu chuẩn carbon tự nhiên trong USP- 43: mẫu (M1) phù hợp với kết quả phân tích carbon sinh học; mẫu M15 từ nguồn tự nhiên, được nhóm nghiên cứu chiết xuất, đạt theo cả 2 phương pháp phân tích (USP- 43 và ^{14}C). Với hoạt độ phóng xạ đo được trong khoảng 13,68 - 13,92 dpm/gC thì mẫu phân tích M1, M3, M6-M8, M10-M16 có chứa 100% carbon sinh học được xác định là các mẫu curcuminoid tự nhiên [12]. Các mẫu curcumin I tổng hợp (M2, M9) có hoạt độ phóng xạ thấp $\leq 5,38$ dmp/g đều cho đơn pic trên sắc ký đồ HPLC. Mẫu mua trên thị trường M4 và M5 có hàm lượng carbon sinh học là 71,2% và 66,7% chỉ ra sự có mặt đồng thời curcumin tổng hợp và curcumin tự nhiên trong mẫu phân tích.

Trên thị trường Việt Nam có xuất hiện đồng thời mẫu curcumin tự nhiên (100%), mẫu curcumin tổng hợp 100% và cả các mẫu curcumin tự nhiên trộn curcumin tổng hợp. Nếu chỉ dùng phương pháp HPLC (USP - 43) có thể xác định được hàm lượng curcumin, tỷ lệ giữa các curcumin trong hỗn hợp nhưng không xác định được nguồn gốc tự nhiên hay tổng hợp của

mẫu curcumin bị trộn lẫn, mẫu curmin I tách từ tự nhiên (M16). Dùng phương pháp phân tích phóng xạ ^{14}C có thể xác định được nguồn gốc tự nhiên - tổng hợp của mẫu curcumin nhưng không xác định được thành phần và hàm lượng của từng loại curcumin I, II, III trong mẫu. Khi kết hợp hai phương pháp trên sẽ cho biết được nguồn gốc của curcumin (tự nhiên - tổng hợp), đồng thời xác định được tỷ lệ các curcumin có trong mẫu phân tích. Kết hợp hai Phương pháp này có thể áp dụng để kiểm tra nguồn gốc curcumin và đánh giá chất lượng curcumin và các sản phẩm có chứa curcumin trên thị trường.

4. Kết luận

Mẫu curcuminoid từ tự nhiên có hàm lượng curcumin I $< 84,21\%$ (so với tổng curcumin I, II, III), đồng thời có hoạt độ phóng xạ trong khoảng 13,68 -13,92 dpm/gC, còn mẫu curcumin tổng hợp có hàm lượng curcumin I là 100% (so với tổng curcumin I, II, III) và có hoạt độ phóng xạ thấp $\leq 5,38$ dmp/gC. Trên thị trường cũng xuất hiện mẫu trộn curcumin tổng hợp vào curcuminoid tự nhiên với có hàm lượng curcumin I (so với tổng curcumin I, II, III) là 90,2% và 94,1% với hoạt độ phóng xạ carbon ^{14}C tương ứng là 9,78 và 9,30 dmp/gC.

Việc kết hợp giữa 2 phương pháp phân tích phân tích HPLC với phân tích đồng vị carbon ^{14}C đã mở ra một hướng mới trong phân biệt nguồn gốc tự nhiên hay tổng hợp của các mẫu curcumin đồng thời xác định được tỷ lệ các curcumin có trong mẫu phân tích. Phương pháp này có thể áp dụng để kiểm tra nguồn gốc curcumin và đánh giá chất lượng curcumin và các sản phẩm có chứa curcumin trên thị trường.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua Nhiệm vụ cấp Bộ, Mã số: 01.2020M002.

Tài liệu tham khảo

1. Akram M., Uddin S., Ahmed A., Usmanghani K., Hannan A., Mohiuddin E., Asif M. (2010), *Curcuma longa* and curcumin: a review article, *Romanian Journal of Biology - Plant Biology*, 55(2), 65-67.
2. Zachariah T. J., Leela N. K. (2015), Curcumin or curcuminoids: Industrial and medicinal potential, *FFI Journal*, 220(4), 309-316.
3. IMARCGROUP (2021), Curcumin market: Global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2022-2027 (Curcumin Market Size, Share | Report, Analysis 2022-2027), Report ID: SR112023A33.
4. BIOPREX curcumin (synthetic) (CAS 458-37-7), Packaging Type: 25 Drum, Packaging Size: 25 kg, Rs 3200/kg | ID: 12723046497 (indiamart.com).
5. Lüer S. C., Goette J., Troller R., Aebi C. (2014), Synthetic versus natural curcumin: bioequivalence in an *in vitro* oral mucositis model. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 14(1). 1-7.
6. Nantasenamat C., Simeon S., Hafeez A., Prachayasittikul V., Worachartcheewan A., Songtawee N., Srungboonmee K., Isarankura-Na-Ayudhya C., Prachayasittikul S., Prachayasittikul V. (2014), Elucidating the Structure-Activity Relationship of Curcumin and Its Biological Activities, Chapter 2 in "*Curcumin: Synthesis, Emerging Role in Pain Management and Health Implications*", Ed. Daniel Lloïc Pouliquen, Nova Science Publishers, 49-86.
7. Ahmed T. and Gilani A. (2014), Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids, *Phytotherapy Research*, 28(4), 517-525.
8. United States (2020) *Pharmacopoeia* 43-NF38, 492 (01/5/2020).
9. Li R., Xiang C., Ye M., Li H. F., Zhang X., Guo D. A. (2011), Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species, *Food Chemistry*, 126 (4), 1890-1895.
10. ICH (1996), *Validation of Analytical Procedures: Text and methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.
11. AOAC (2012), *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.
12. ISO (2019), "ISO 16620-2:2019." Switzerland.
13. University of Groningen (RUG), Reference radiocarbon values for 100% biogenic carbon ($^{14}\text{C}_{\text{bio}}$) based on atmospheric $^{14}\text{CO}_2$, [Online]. Available: <https://www.rug.nl/research/centre-for-isotope-research/customers/tools/reference-radiocarbon-values-palstra-and-meijer/?lang=en> (thời gian truy cập: 05/8/2022).